



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO

**Inhibidores de la quinasa GSK-3 β en el
tratamiento de la enfermedad de Alzheimer**

Autor: Helena Chaves Varela

D.N.I.: 45953240E

Tutor: José Carlos Menéndez Ramos

Convocatoria: Junio 2016

ÍNDICE

0. RESUMEN Y ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	3
1.1. <u>ENFERMEDAD DE ALZHEIMER</u>	3
1.2. <u>FISIOPATOLOGÍA</u>	3
1.3. <u>TRATAMIENTO ACTUAL</u>	4
2. OBJETIVOS	5
3. MATERIAL Y MÉTODOS	5
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	5
4.1. <u>¿QUÉ SE CONOCE DE LA GSK-3β?</u>	5
4.1.1. GSK-3 β EN EL ORGANISMO	5
4.1.2. ESTRUCTURA QUÍMICA	6
4.1.3. CONFORMACIÓN ACTIVA Y REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD QUINASA	8
4.1.4. SUSTRATOS Y REACCIÓN DE FOSFORILACIÓN	9
4.2. <u>¿POR QUÉ SE CREE QUE LA GSK-3β PUEDE SER DIANA TERAPÉUTICA EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER?</u>	10
4.2.1. RELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD QUINASA DE LA GSK-3 β A NIVEL NEURONAL Y LA FISIOPATOLOGÍA DE LA EA	10
4.2.2. RELACIÓN ENTRE OTRAS ACCIONES DE LA GSK-3 β A NIVEL NEURONAL Y LA FISIOPATOLOGÍA DE LA EA	11
4.3. <u>¿CÓMO CONSEGUIR LA INHIBICIÓN DE LA GSK-3β PARA TRATAR LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER?</u>	11
4.3.1. MECANISMOS DE INHIBICIÓN DE LA GSK-3 β	11
4.3.2. MOLÉCULAS INHIBIDORAS DE LA GSK-3 β	12
5. CONCLUSIONES	18
6. BIBLIOGRAFÍA	19

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una de las enfermedades neurodegenerativas más relevantes en la actualidad, cuya incidencia aumenta progresivamente y para la cual no se dispone de tratamiento efectivo alguno. Debido al desconocimiento de su etiopatogénesis exacta, han surgido diversas líneas de investigación basadas en la búsqueda de fármacos que curen la enfermedad.

De entre las numerosas hipótesis existentes, parece ser que el fenómeno de hiperfosforilación de tau es uno de los más influyentes y característicos de la EA. Por esta razón se ha definido a la quinasa GSK-3 β (responsable de esta fosforilación) como una de las dianas más prometedoras en la carrera por el desarrollo de compuestos farmacológicos de utilidad terapéutica, capaces de inhibir al enzima y, por tanto, detener el progreso de la EA.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is one of the most relevant neurodegenerative diseases nowadays, whose incidence shows a progressive increase and to whom there is no effective treatment available. Due to the fact that its exact etiopathogenesis remains still unknown, several research pathways, based on the seek for curative drugs, have emerged.

Among the amount of existing hypothesis, it seems that the hyperphosphorylation of tau is one of the most influent and characteristic features of the AD. Therefore, the kinase known as GSK-3 β (responsible for this phosphorylation) has been established as one of the most promising targets in the race for the development of different useful pharmacological compounds, whose ability to inhibit the enzyme allows them to halt the progression of the AD.

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

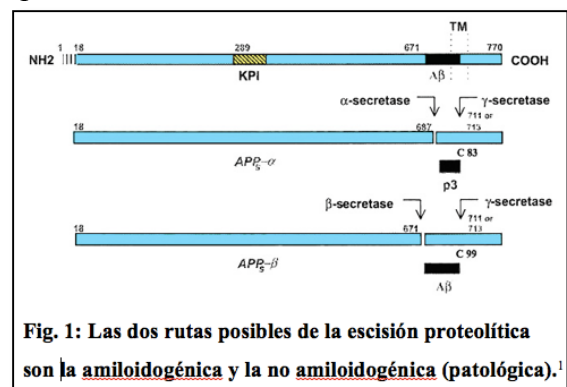
La gravedad de la **enfermedad de Alzheimer (EA)** reside en que es una de las principales causas de demencia y en que puede aparecer tanto en la vejez como en la madurez (demencia senil o presenil, respectivamente). Debemos entender la **demencia** como la pérdida de las funciones cognitivas, de la memoria y de las capacidades sociales, pero no como la pérdida de la consciencia. Siendo una enfermedad que presenta una **prevalencia elevada**, que se prevé que crezca de manera alarmante en las próximas décadas (debido al aumento en la esperanza de vida), numerosos especialistas en el campo de la salud dedican sus esfuerzos a encontrar una solución, identificando sus posibles detonantes.

1.2 FISIOPATOLOGÍA

En los pacientes que desarrollan esta enfermedad, 10 o 15 años antes de la aparición de los primeros síntomas se empiezan a formar las dos lesiones cerebrales características de la EA: **los ovillos neurofibrilares y las placas seniles**. Los biomarcadores presentes en estas lesiones (proteína tau y péptido A β , respectivamente) serán objeto de búsqueda cuando aparezcan los primeros síntomas, mediante las diferentes técnicas diagnósticas existentes. Dado que **la fisiopatología exacta no ha sido demostrada en su totalidad**, existen numerosas hipótesis etiológicas defendidas a lo largo de los últimos años que han servido de base para el desarrollo de nuevos tratamientos farmacológicos.

Por una parte, **las placas seniles** se componen de diferentes subunidades de péptido β -amiloide (A β), originado a partir de la proteína precursora de amiloide (APP). Esta APP se encuentra integrada en la membrana plasmática neuronal y, normalmente, sufre una proteólisis secuencial (dos pasos) mediada por dos enzimas (α -secretasa y γ -secretasa), liberando dos fragmentos peptídicos necesarios para la realización de funciones celulares.

Sin embargo, en las neuronas de pacientes con EA, la primera escisión es llevada a cabo por la β -secretasa en lugar de la α -secretasa, lo que provoca que los dos fragmentos sean diferentes a los anteriores una vez que la γ -secretasa realiza el segundo corte. Se libera así el péptido β -amiloide, que



será finalmente degradado en el medio extracelular. En condiciones normales, la formación de este péptido está regulada, aunque en la EA se ha observado un descontrol en este proceso, por lo que existe una producción anormal del mismo. **El A β en exceso se agrega formando fibras insolubles que forman a su vez conglomerados densos, conocidos como placas seniles**, lo que provocará finalmente una disrupción en el funcionamiento normal de la neurona.

Por otra parte, **los ovillos neurofibrilares** son agregados insolubles de proteína tau modificada. En una neurona normal, la proteína tau rodea a los microtúbulos del esqueleto del axón neuronal, estabilizándolos, haciendo posible de esta manera la transmisión del impulso nervioso. **En las neuronas dañadas de las personas con EA las proteínas tau son defectuosas (están hiperfosforiladas)**, por lo que se separan de los microtúbulos, se unen entre ellas y forman filamentos. Como resultado, se produce así la disociación de los microtúbulos y la desorganización del esqueleto celular, lo que conlleva la interrupción del transporte celular y la degeneración de la neurona.

Esta correlación entre placas y ovillos se refuerza por la sospecha de que la hiperfosforilación de la proteína tau de los ovillos puede estar relacionada con la hiperactividad de algunas quinasas (ej.: MAPK, CDK5, GSK3,...) inducidas posiblemente por las formas fibrilares de la β -proteína amiloide de las placas seniles.

A pesar de que la mayoría de los casos de Alzheimer son de naturaleza esporádica, existe una forma familiar en un 0,1% del total de los casos que se debe a mutaciones autosómicas dominantes, responsables de una aparición temprana de la enfermedad.¹⁵

1.3 TRATAMIENTO ACTUAL

Cabe destacar que la mayor parte de la terapia farmacológica actual se basa en la hipótesis más antigua, que consiste en la depleción de acetilcolina (ACh), característica de pacientes con EA, y la consecuente disfunción del sistema de neurotransmisores. **La hipótesis colinérgica, a pesar de sus limitaciones, es la base del tratamiento farmacológico actual para la EA, aunque estos fármacos solo constituyen una forma de terapia paliativa.**

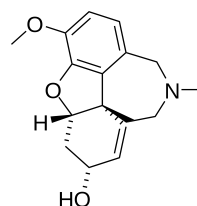
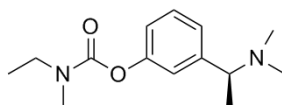
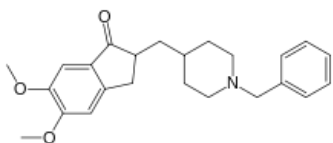
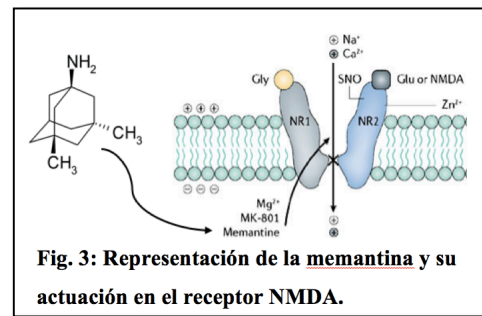


Fig. 2: Donepezilo, Rivastigmina y Galantamina, respectivamente.

Son tres inhibidores reversibles de acetilcolinesterasa.

Otra de las opciones terapéuticas consiste en la **inhibición de los receptores NMDA**, estrechamente relacionados con la neuroplasticidad y la memoria. El uso de antagonistas de este receptor, como es el caso de la memantina, consigue disminuir las concentraciones patológicas de glutamato. Se usa en estadios más avanzados, tanto sola como en combinación con algún inhibidor de los anteriores.



2. OBJETIVOS

- Recoger y analizar toda la información posible sobre la **enfermedad de Alzheimer** y los **inhibidores de la GSK-3 β** .
- Comprender el fundamento del **uso de los inhibidores** de la GSK-3 β como posibles **fármacos** para el tratamiento de esta patología.
- Evaluar la existencia de **base científica suficiente** para considerar a los inhibidores de la GSK-3 β como horizonte terapéutico.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

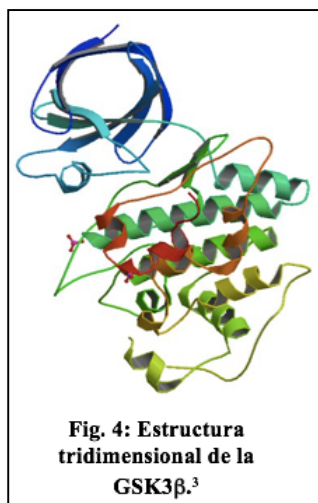
Revisión bibliográfica de diversas fuentes de información, sobre la EA y, más específicamente, sobre el papel que desempeñan la GSK-3 β y su inhibición en el futuro de la terapia farmacológica de esta enfermedad. **Se han utilizado bases de datos** como PubMed, Medline, Sigma Aldrich o Expasy, además de diversos **libros o artículos** contenidos en Google Books y Google Academics. Todo este material ha sido encontrado mediante la **búsqueda de palabras clave** como: “Alzheimer’s disease”, “GSK-3 β ”, “GSK-3 β inhibitors” y “tau pathology”.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ¿QUÉ SE CONOCE DE LA QUINASA GSK-3 β ?

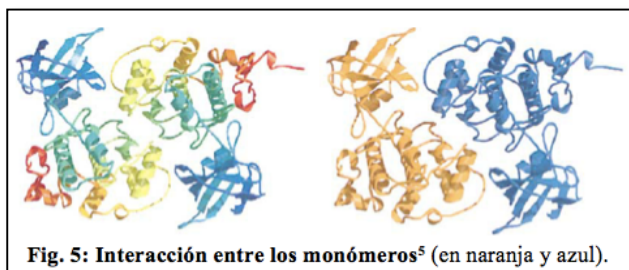
4.1.1 GSK-3 β EN EL ORGANISMO

La GSK-3 es una proteína presente en diversos mamíferos, muy conservada y representada por **dos isoformas** que se expresan por todo el organismo (sobre todo en el cerebro en desarrollo y adulto, a nivel de dendritas y axones): GSK-3 α y la GSK-3 β , codificadas por genes distintos (situados en los cromosomas 19 y 3, respectivamente).²



A lo largo de todo este trabajo nos referiremos a la **GSK-3 humana**. Por su parte, la GSK-3β actúa como una serina-treonina quinasa, perteneciente a la subfamilia de GSKs (glucógeno sintasa quinasas), que a su vez pertenece a la superfamilia de las MAPKs (protein-quinasas activadoras por mitógenos)³. Está involucrada en multitud de rutas metabólicas: tanto inhibiendo la glucogenosíntesis (vía de señalización de PI3K desencadenada por la insulina y la hormona del crecimiento) como favoreciendo el desarrollo neuronal y embrionario (vía de Wnt), y es por lo que interviene en numerosas patologías.⁴

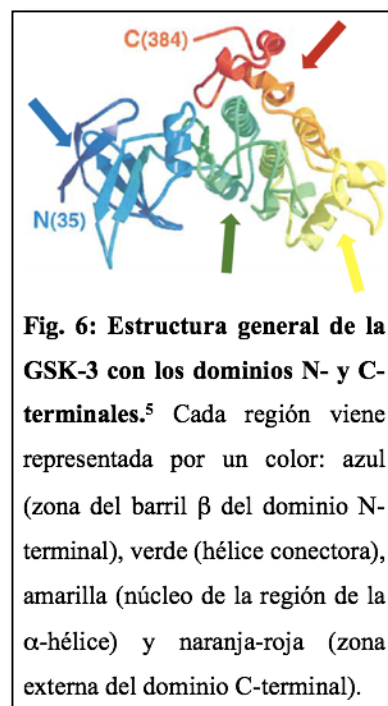
4.1.2 ESTRUCTURA QUÍMICA



Gracias a diversos estudios cristalográficos, se ha podido elucidar la estructura tridimensional de esta enzima, que es un complejo dimérico cuaternario cuyas dos subunidades están relacionadas simétricamente.

Ambas isoformas de la GSK-3 (α y β) son casi idénticas: en su dominio catalítico (sitio de unión a ATP) comparten un 98% de homología, mientras que en general presentan una similitud del 84 % (se diferencian en el dominio N-terminal de manera significativa), por lo que tienen propiedades bioquímicas muy similares.² La estructura base de la GSK-3 presenta la conformación característica “**bucle de activación**” de las protein-quinasas: un dominio N-terminal de láminas β acoplado a un dominio C-terminal de α-hélices.⁵

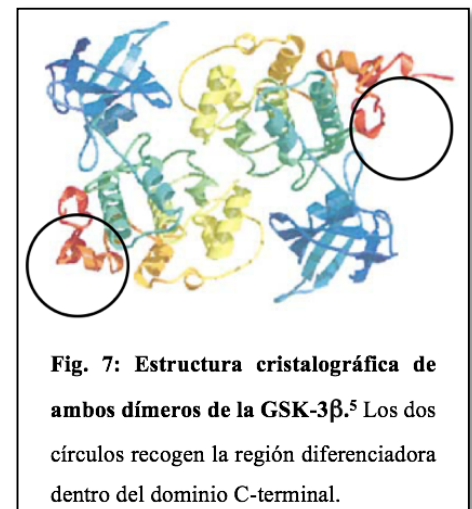
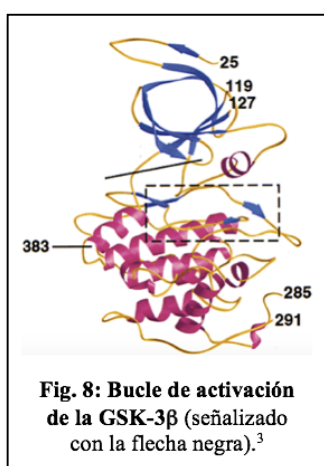
A pesar de que la longitud completa del enzima en los humanos sea de 420 aminoácidos, **la densidad electrónica solo permite visualizar con claridad 351** de ellos (aquellos comprendidos entre Lys35 y Ser386). Los fragmentos de proteína externos (antes de Lys35 y después de Ser386) presentan una estructura desorganizada, aunque se piensa que pueden ser regiones muy flexibles.⁵



Por una parte, **el dominio N-terminal** (35-134) se compone de 7 láminas β que se disponen de manera antiparalela y que se tuercen y se enrollan sobre sí mismas para formar un **barril β** (estructura cerrada en la que la primera cadena de láminas β se une a la última a través de puentes de hidrógeno)⁵. Las láminas β 5ª y 6ª están interconectadas por una hélice corta que se empaqueta contra el barril β y que está conservada en un gran número de quinasas (dos de sus residuos son muy relevantes para su actividad catalítica)³. Por último, la 7ª se une al resto de la proteína por una hélice (138-149).

Por otra parte, **el núcleo del dominio de α -hélice** (152-342) presenta una topología similar a regiones equivalentes en diferentes MAPK (ERK2 y p38), mientras que más allá de este fragmento aparecen numerosos residuos C-terminales (342-386) que forman una **serie de hélices y bucles** que se aproximan a la **zona helicoidal conectora** (155-175), y no al dominio N-terminal, como cabría esperar en el caso de las MAPKs.

Cabe destacar que **las subunidades que conforman el dímero completo no son simétricas**: los dominios C-terminales de cada monómero poseen diferentes uniones reticulares cristalinas. Esto da lugar a que se puedan observar **estructuras divergentes**: uno de los monómeros presentará un segmento (desde Pro379 hasta Arg383) en forma de hélice, mientras que el otro presentará una conformación extendida.⁵



Como ya se ha comentado previamente, las protein-quinasas se caracterizan por tener un **sitio de activación susceptible de ser fosforilado por otras enzimas**, controlando así la actividad catalítica de las primeras. En el caso de la GSK-3 β , este se conoce como **bucle de activación** (200-226) y se encuentra en la superficie del lugar de unión al sustrato, flanqueado por una región bisagra y un bucle rico en glicina³.

4.1.3 CONFORMACIÓN ACTIVA Y REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD QUINASA

Al igual que el resto de Ser/Thr-quinasas, la GSK-3 β debe **adquirir una conformación activa alineando sus dominios de α -hélice y lámina- β** . Para ello, residuos polares presentes en el bucle de activación (Arg96, Arg180 y Lys205) se unen a un grupo fosfato del residuo Tyr216 (sitio de fosforilación) y se consigue el alineamiento de ambos dominios y, por consiguiente, la apertura del sitio de unión al sustrato (quinasa activa).³

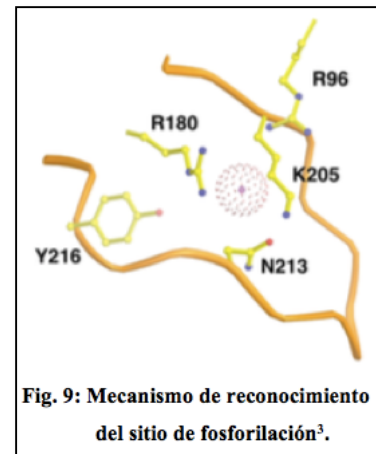


Fig. 9: Mecanismo de reconocimiento del sitio de fosforilación.³

La **actividad quinasa** de la GSK-3 β es muy alta en células en reposo (no estimuladas), por lo que **es regulada por señales extracelulares** con el fin de inducir una rápida, a la par que reversible, disminución de su actividad. Al no ser un enzima constitutivamente activo, **debe ser activado/inhibido por diferentes mecanismos**⁶:

a) **FOSFORILACIÓN DEL ENZIMA** → en la GSK-3 β se conocen **4 residuos**

susceptibles de ser fosforilados por otras quinasas (o incluso autofosforilados): **Ser9, Thr43, Ser389 y Thr390**. Mientras que los dos primeros implican una inhibición enzimática directa, existen indicios de que los dos últimos inducen un aumento en la capacidad de la Ser9 de ser fosforilada (inhibición indirecta).⁶

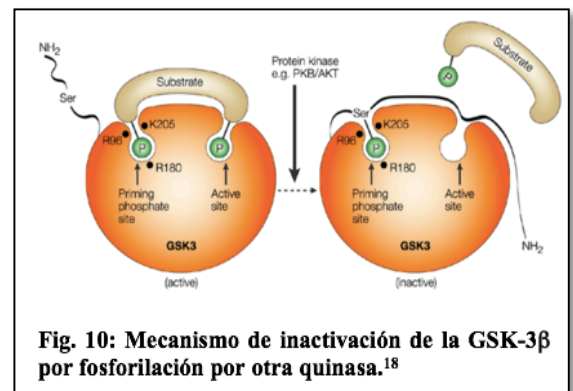


Fig. 10: Mecanismo de inactivación de la GSK-3 β por fosforilación por otra quinasa.¹⁸

b) **ASOCIACIÓN DE COMPLEJOS PROTEICOS** → mecanismo desconocido por el cual GSK-3 β se une a diferentes proteínas para **conseguir inducir** (ej.: complejo multiproteico de GSK-3 β +axina+APC) **o inhibir** (ej.: GBP = proteína de unión a GSK-3 β) **la fosforilación de sustratos por parte de GSK-3 β** .⁶

c) **FOSFORILACIÓN PREVIA O ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO** → a pesar de que los sustratos de GSK-3 β no necesitan una secuencia específica para ser reconocidos por ella, sí **requieren una fosforilación previa por otra quinasa** (CDK5/PAR1/PKC/PKA) en alguno de sus residuos (Ser/Thr en región C-terminal) **para que el bucle de activación los reconozca** y puedan ser modificados.⁶

- d) **LOCALIZACIÓN SUBCELULAR** → la mayor parte de la actividad enzimática de la GSK-3 β tiene lugar **tanto en el citoplasma como en el núcleo, sobre todo de neuronas primarias**. Según diversos estudios, se sugiere que esta enzima interviene, en el núcleo, en la fosforilación de diferentes factores de transcripción (ej.: β -catenina), en el splicing alternativo y, posiblemente, en procesos proapoptóticos de muerte neuronal. Asimismo, en el citoplasma se ha demostrado su papel en la vía de señalización de Wnt (importante en cáncer y en DMT2).⁶
- e) **ESCISIÓN PROTEOLÍTICA** → la **calpaína** es un enzima **capaz de escindir un fragmento peptídico de la región N-terminal de la GSK-3 β** (que contiene el residuo Ser9, objeto de regulación por fosforilación), **quedando así activada la quinasa**. Esta calpaína, a su vez, es activada por el **receptor NMDA** presente en las neuronas del hipocampo, por lo que la **memantina**, al inhibir a este receptor, puede inhibir la activación de la calpaína y, por tanto, la activación de la GSK-3 β ⁶ (mecanismo que podría explicar el uso de la memantina en esta patología).

4.1.4 SUSTRATOS Y REACCIÓN DE FOSFORILACIÓN

GSK-3 β es responsable de la fosforilación de multitud de sustratos, aunque no realiza esta función de la misma manera ni con la misma eficacia. Los sustratos presentan una **secuencia aminoacídica determinada** que la GSK-3 β reconoce de manera específica: **S-XXX-S** (una Ser en posición P seguida de tres residuos aleatorios y de una segunda Ser final). Por lo general, los sustratos deben estar **previamente fosforilados** por otra quinasa en la **Ser en posición P+4**, lo que supone un aumento del rendimiento de la reacción.³

Usando el parecido (25% idéntica y 41% similar) de nuestra enzima con la CDK2, podemos estimar el **modelo de unión enzima-sustrato**. Una vez que el **sustrato alcance el bucle de activación** (su Ser en P+4 ocupará el lugar del ión fosfato de la imagen) que se encuentra enfrente del sitio activo, **hará contacto con los residuos Arg96, Arg180 y Lys205 del bolsillo de unión al sustrato** y, por tanto, **los dominios α y β se alinearán**.³

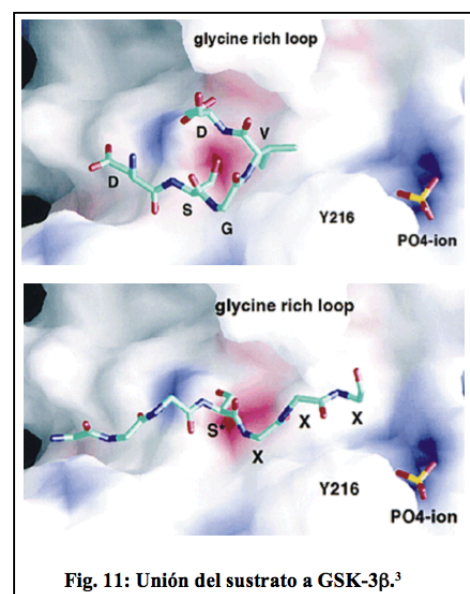


Fig. 11: Unión del sustrato a GSK-3 β .³

Cualquier mutación en alguno de los tres residuos impide la actividad quinasa sobre los sustratos fosforilados previamente, pero no sobre los no fosforilados.² Sin embargo, en la EA lo que se produce es una hiperfosforilación de la **proteína tau**. Este sustrato es uno sobre los que la GSK-3 β actúa de manera diferente, ya que **puede no estar previamente fosforilado.³**

4.2 ¿POR QUÉ SE CREE QUE LA GSK-3 β PUEDE SER DIANA TERAPÉUTICA EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER?

4.2.1 RELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD QUINASA DE LA GSK-3 β A NIVEL NEURONAL Y LA FISIOPATOLOGÍA DE LA EA

Como ya se ha comentado, la **fosforilación de tau es la modificación post-traducciona más importante** en la patología de la EA, además de la formación de los péptidos de amiloide. A pesar de que existen numerosas quinasas que han demostrado su capacidad de fosforilación de la proteína tau *in vitro*, no se sabe con certeza cuáles de ellas son responsables *in vivo*. Por tanto, es **la capacidad de GSK-3 β de fosforilar tau** la razón por la que se ha establecido como posible diana terapéutica.

Diversos ensayos con ratones mutantes han conseguido demostrar tanto la **relación de la GSK-3 β con un incremento en la agregación de tau en ovillos neurofibrilares**, como la **relación entre la presencia de placas seniles con el aumento del grado de taupatía**. De hecho, de acuerdo con la hipótesis de la cascada amiloide, **la formación de placas se produce en primer lugar**, motivada por el ambiente de estrés oxidativo y de inflamación del medio extracelular cerebral. Esta **sobrecarga de péptido β -amiloide** es capaz de **inducir la actividad de la GSK-3 β** a nivel de hipocampo y corteza cerebral, lo que implica la **hiperfosforilación de tau**. A pesar de que la serie de procesos intermedios que conectan unos hechos con otros carecen aún de explicación científica suficiente, sí está claro que **la GSK-3 β se consolida como punto de unión entre las dos lesiones cerebrales** características de la EA, constituyéndose de esta forma la **“hipótesis de la GSK-3 β ”**.

4.2.2 RELACIÓN ENTRE OTRAS ACCIONES DE LA GSK-3 β A NIVEL NEURONAL Y LA FISIOPATOLOGÍA DE LA EA

Finalmente, solo añadir que existen **otros mecanismos patológicos de la EA**, además de la hiperfosforilación de tau, **en los que interviene la GSK-3 β** . Por ejemplo, se estudia la posibilidad de que la GSK-3 β pudiese estar involucrada, entre otros, en:

- **El empalme del mRNA de tau**, reduciendo la unión de los microtúbulos.²
- **La regulación del metabolismo de APP**, aumentando tanto la producción como la toxicidad del péptido A β .²
- **La modificación de la localización y la función de la PS1** (presenilina 1), reduciendo viabilidad neuronal y plasticidad sináptica.²
- **La promoción de respuestas inflamatorias cerebrales locales y de muerte celular**, aumentando la supervivencia celular ante condiciones citotóxicas.⁷

4.3 ¿CÓMO CONSEGUIR LA INHIBICIÓN DE LA GSK-3 β PARA TRATAR LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER?

4.3.1 MECANISMOS DE INHIBICIÓN DE LA GSK-3 β

Como se ha comprobado que la **GSK-3 β se encuentra sobreexpresada tanto en hipocampo como en linfocitos periféricos circulantes** de los pacientes con EA⁷, además del hecho de que **nuestro organismo es incapaz de regular a la baja esta quinasa**⁸, se debe encontrar la manera de inhibirla desde fuera. Antes de nada, deben determinarse con exactitud los posibles mecanismos de inhibición del enzima, para así poder conocer qué moléculas intervienen, de qué manera lo hacen y qué resultados se obtienen⁷:

- a) **INHIBICIÓN POR METAL** → se basa en la **competencia entre el metal y los iones Mg⁺** presentes de manera natural en el bolsillo de unión a ATP de muchas quinasa, responsables de esta unión.
- b) **INHIBICIÓN EN EL SITIO DE UNIÓN A ATP** → se basan en la **competencia entre moléculas pequeñas y el ATP** por su sitio de unión a la quinasa.
- c) **INHIBICIÓN EN EL SITIO DE UNIÓN A MOLÉCULAS DIFERENTES DE ATP** → consiste en la **unión de moléculas en el bucle de activación enzimático** (en contacto con la triada catalítica: Arg96, Arg180 y Lys205) **para impedir así la orientación correcta del sustrato** en su lugar de unión al enzima, sin competir directamente con el ATP.

d) **INHIBICIÓN POR PEPTIDOMIMÉTICOS** → los péptidomiméticos **compiten también con el sustrato**, impidiendo su unión en el sitio catalítico de la GSK-3 β .

4.3.2 MOLÉCULAS INHIBIDORAS DE LA GSK-3 β

Siguiendo las directrices de los mecanismos naturales de inhibición de la GSK-3 β , se han desarrollado **varias familias de moléculas** que parecen poseer utilidad terapéutica:

1) **METALES** → en este grupo el **litio** es el más representativo, ya que ha sido el primer inhibidor de la GSK-3 β usado en EA, por su efecto en la reducción de la incidencia de EA y demencia en pacientes bipolares tratados con litio.⁶ Su actividad puede ser directa, compitiendo con el Mg⁺ para impedir la unión del ATP al enzima, o indirecta, por aumento indirecto de inhibición de la GSK-3 β por fosforilación en la Ser9.⁷

Además, existen otras opciones como el **ión Be²⁺**, que compite tanto con el Mg⁺ como con el ATP, lo que nos indica que el Be²⁺ puede unirse en dos sitios diferentes: uno es sensible al litio y el otro (no sensible al litio) une al magnesio formando un complejo con el ATP.⁷ Por otra parte, el **ácido valproico** es otro estabilizador del estado de ánimo (EEA) usado en la inhibición de la GSK-3 β , aunque lo hace por otra vía que implica la inhibición directa de la histona desacetilasa.⁹

A pesar de su capacidad de reducir la taupatía y la patología amiloide *in vivo*, además de su baja toxicidad y su buen perfil farmacocinético, hay que tener en cuenta que **el litio no es específico únicamente para GSK-3 β y puede llegar a ser neurotóxico**. Este hecho, sumado a que tanto el transporte de APP como la producción de A β pueden producirse por vías desligadas de tau, empujan las líneas de investigación hacia otros EEA o, incluso, hacia otro tipo de inhibidores.²

2) **ATP-COMPETITIVOS** → con el deseo de hacer inhibidores más específicos, se empezaron a estudiar **pequeñas moléculas**, clasificadas en dos generaciones: **naturales y sintéticas**. De entre estas últimas, la mayoría comparten rasgos estructurales comunes, como núcleos heterocíclicos sustituidos.⁸ Sin embargo, este grupo carece de selectividad (son capaces de inhibir otras quinasas), por lo que afectan a otros tejidos y provocan efectos secundarios no deseados.⁹

NATURALES	Indirrubinas	Obtenidos de moluscos, se usan en la medicina china tradicional para el tratamiento de diferentes patologías crónicas (leucemia). ⁹
	Meridianinas	Derivados bromados de 3-(2-aminopirimidina)-indoles (aislados del tunicado <i>A. meridianum</i>). ¹⁰
	Himendialdisinas	Obtenido de esponjas marinas. ⁹
SINTÉTICOS	CHIRs	Derivados aminopirimidínicos análogos de purina. ¹⁰
	Agonistas M1	Agonistas muscarínicos.
	Aminotiazoles	Pequeñas moléculas con núcleo aminotiazol y derivados. ⁷
	Paulonas	Derivados de benzazepinonas obtenidas por síntesis indólica de Fischer (usando fenilhidrazinas en CH ₃ COOH y H ₂ SO ₄ conc.). ⁹
	Maleimidas	Derivados bisindolilmaleimídicos de estaurosporina. ⁹

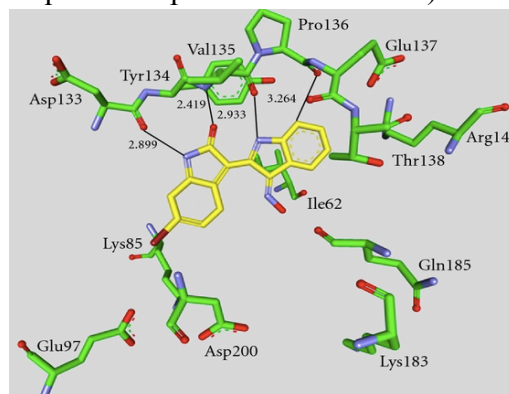
INDIRRUBINAS

Inconvenientes: baja solubilidad, baja absorción y alta toxicidad gastrointestinal.⁹

Único tipo de indoles/bis-indoles capaces de inhibir a la GSK-3β: se unen por 3 enlaces de hidrógeno a los residuos Asp81 y Val83 de la quinasa.⁹

Algunos de estos compuestos también inhiben a la CDK5 (otra quinasa capaz de fosforilar tau).⁹

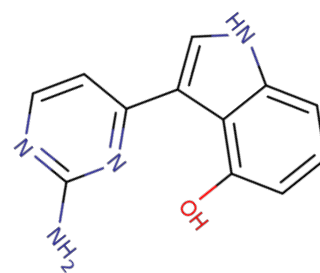
Existen inhibidores específicos de GSK-3β: 5,5'-dibromo-indirrubina y 6-bromoindirrubina-3'-oxima (**6-BIO**)⁸. Este último es un derivado semisintético de la 6-bromoindirrubina más selectivo por GSK-3β (gracias a un puente de H con Thr138 y Gln185)¹⁹ que por las CDKs, capaz de atenuar la hiperfosforilación de tau y la acumulación de Aβ, aunque aún existen discrepancias.¹⁰



MERIDIANINAS

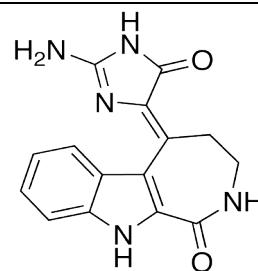
Inhibidoras de quinasas: penetran en la célula e interfieren con las quinasas que intervienen en procesos de división y muerte celular, inhibiendo la proliferación e induciendo la apoptosis.¹⁰

Desventaja: muestran mayor selectividad por CDKs que por GSK-3β.¹⁰



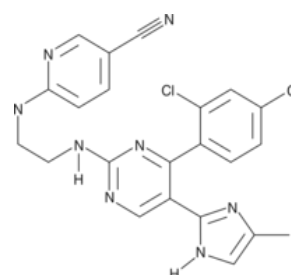
HIMENIALDISINAS

- Potente inhibidor de GSK-3 β , por inhibición de la fosforilación del enzima por MAP-1B⁸, aunque inhibe también otras quinasas (CDKs, MEK1, CK1,...).¹⁰
- Bloquea la hiperfosforilación de tau en los sitios en los que actúa la GSK-3 β .⁹
- Acción antiinflamatoria por inhibir la intervención de la GSK-3 β en el funcionamiento nuclear de la NF- κ B (dibromohimenialdisina).⁹



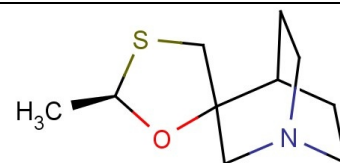
CHIRs (Lab. Chiron)

- **CHIR98014, CHIR 98023 y CHIR 99021:** alta selectividad por GSK-3 β .
- Ensayos en cultivos celulares cerebrales: reducción de fosforilación de tau, de sobrecrecimiento de neuritas y de depresión a largo plazo mediada por NMDA. Asimismo, al igual que la 6-BIO, son capaces de imitar la activación de la vía de Wnt, favoreciendo la renovación y pluripotencia celular.¹⁰



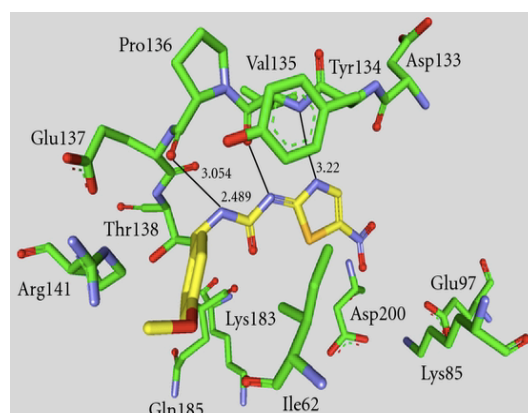
AGONISTAS MUSCARÍNICOS

- Acción colinérgica: mejora de la función cognitiva.
- Acción promotora de vías de procesamiento del APP y reductora de la hiperfosforilación de tau: modificación directa de la enfermedad.
- **AF102B y AF150:** reducción de la fosforilación de tau por inhibición de GSK-3 β .



AMINOTIAZOLES (Lab. AstraZeneca)

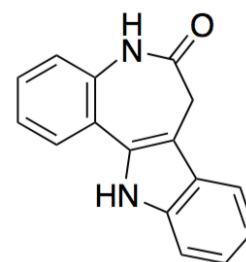
- **AR-A014418:** inhibición sitio-específica (Ser396) de la GSK-3 β .⁷ Consigue los mismos efectos que las anteriores: neuroprotección en condiciones apoptóticas inducidas por PI3K y prevención de neurodegeneración en zonas del hipocampo expuestas a A β .¹⁰
- **AZD1080:** compuesto estructuralmente cercano que ha conseguido entrar en la fase I de ensayos clínicos como terapia para EA, aunque ya ha sido retirado.⁷



PAULONAS

Inhibidores de las CDKs (reguladoras del ciclo celular): la sustitución de un grupo aceptor de enlaces de H en la posición 9 del inhibidor aumenta la afinidad.

Inhibidores de la GSK-3 β : alsterpaulona (9-nitropaulona) es el compuesto de síntesis más potente, con utilidad en la EA, además de presentar una destacable actividad antitumoral *in vitro*. Algunos derivados (1-azakenpaulona y 9-ciano-1-azapaulona) son más selectivos por la GSK-3 β . Tanto la alsterpaulona como la kenpaulona previenen muerte neuronal en respuesta a estímulos, aunque la primera reduce la fosforilación de tau mientras que la segunda reduce la formación de A β .¹⁰



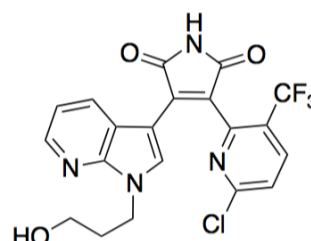
MALEIMIDAS (Lab. GlaxoSmithKline)

Inhibidores específicos de PKC e inhibidores directos de GSK-3 β :

GF109203x y Ro 31-8220.

Ro 31-8220: inhibidor más potente de esta familia. Además, también actúa inhibiendo directamente los canales de Na⁺ voltaje-dependientes.

SB-216763 y SB-415286: arilindolmaleimidas con la capacidad de proteger neuronas primarias de la muerte celular inducida por la reducción en el funcionamiento de la ruta de la PI3K, gracias a la inhibición de la GSK-3 β (efecto neuroprotector por modulación de los sustratos de la GSK-3 β y de la β -catenina). Presentan utilidad en el tratamiento de patologías neurodegenerativas (EA) ya que consiguen reducir los efectos neurotóxicos de A β y disminuir los niveles de fosforilación de tau, de caspasa-3 y de actividad de la JNK activada por estrés.¹⁰



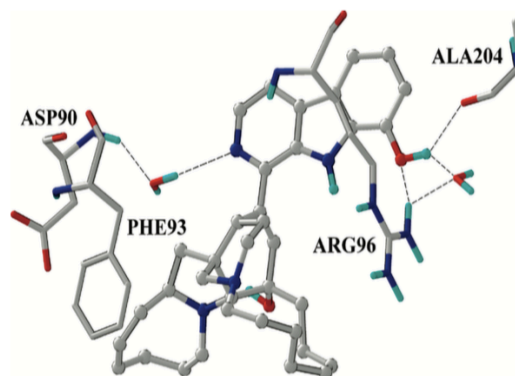
3) **NO ATP-COMPETITIVOS** → los **productos naturales** desempeñan un papel fundamental en la búsqueda de compuestos que nos sirvan como **cabezas de serie** para el **posterior diseño de compuestos sintéticos con utilidad terapéutica**. Teniendo en cuenta las ventajas que supone no competir con ATP, los **moduladores alostéricos** son las moléculas más prometedoras en la búsqueda de terapias eficientes para la EA.

NATURALES	Palinurina	Furanosesquiterpenos aislados de esponjas marinas. ⁷
	Manzamina	Alcaloides derivados de β -carbolina aislados de esponjas marinas. ⁷
SINTÉTICOS	Derivados de TDZD	Productos secundarios obtenidos por reacción entre isocianatos y cloruros de N-alkil-S-[N'-(clorocarbonil) amino]isotiocarbamoílo. ⁹
	Halometilcetonas	Derivados cetónicos capaces de atravesar la membrana plasmática. ¹⁰

COMPUESTOS NATURALES

Palinurina (y su metabolito tricantina): mecanismo de unión aún por determinar. Inhibidores de GSK-3 β permeables a la célula capaces de reducir la fosforilación de tau.

Manzamina: se puede afirmar que la molécula completa (manzamina A) se comporta como farmacóforo, ya que sus precursores (carbolina e ircinal A) no eran capaces por separado de inhibir a GSK-3 β .¹⁰ A pesar de que se han descrito algunas de las uniones importantes al enzima, el mecanismo de unión completo está aún por determinar. Por ejemplo, se conoce que el N terciario del anillo β -carbonílico forma un puente de H con el grupo amino de Asp90, mediado por una molécula de H₂O. También se conoce que existen interacciones tanto hidrofóbicas (una en Phe93 con el anillo de 8 átomos y otra en Arg96 con el anillo β -carbonílico) como electrostáticas (en Arg96 y Ala204).¹¹



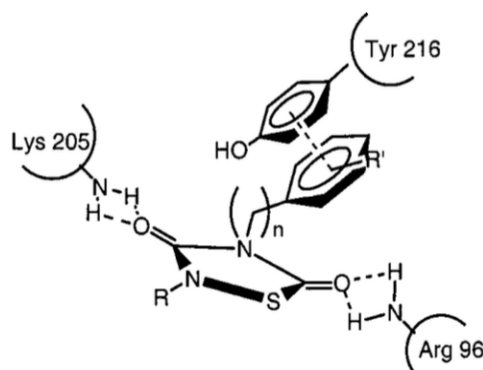
TIADIAZOLIDINONAS

Estudios SAR:

- La naturaleza y el tamaño de los sustituyentes en los N de los derivados son cruciales para la inhibición de GSK-3 β .¹²
- La disposición en 1,3 de los carbonilos/tiocarbonilos en el heterociclo puede ser crítica para la unión a GSK-3 β .¹²

Mecanismo de unión: puede que el primer paso sea la unión del compuesto al residuo fosfato fosforilado

previamente (situado en el sitio de unión al sustrato de la GSK-3 β). Posteriormente, diversas interacciones tienen lugar con los aminoácidos presentes en el sitio catalítico de GSK-3 β : interacciones electrostáticas (en Arg96 y Lys205 con los carbonilos del heterociclo) e hidrofóbicas (entre Tyr216 y el radical arilo en N⁴).¹³



Ventajas:

- **Alta especificidad** por GSK-3 β , ya que no inhiben otras quinasas como PKA/C o CDK1/ciclina B.⁹
- **Menos oncogenicidad**, ya que no bloquean la fosforilación de otros sustratos por el ATP.⁹
- Con admin. oral (3 semanas) se observa disminución significativa de A β (efecto dosis-dependiente).⁷

Desventajas: sin embargo, al inhibir la GSK-3 β induce un **aumento en los niveles celulares de β -catenina**, lo que conlleva una mayor propensión a padecer ciertos cánceres.⁹

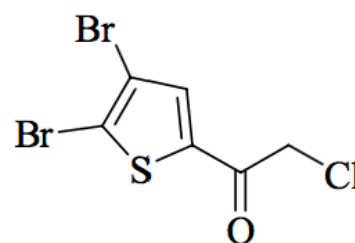
TIADIAZOLIDINONAS

NP031112, NP-12 o Tideglusib (Neuropharma)⁷: TDZD de 2ª generación, con perfil ADME mejorado (permeable a barrera hematoencefálica), actualmente en fase II de ensayo clínico.⁷ Posee la ventaja de evitar resistencias al tratamiento posterior con otros inhibidores de GSK-3 β .¹⁴

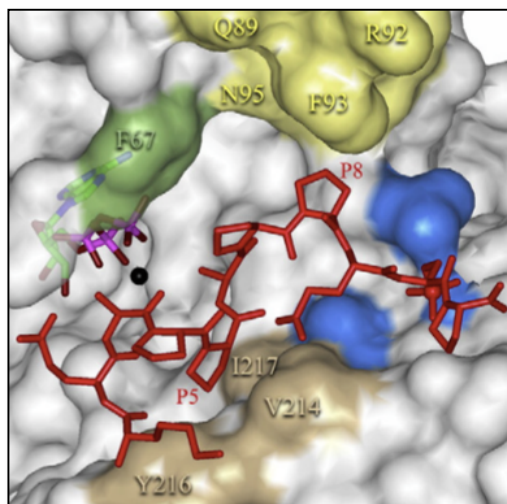
Derivados de N-fenil-prenilamina: inhibidores duales de GSK-3 β y β -secretasa, lo que resulta en un efecto combinado de disminución tanto de la hiperfosforilación de tau como de la formación del péptido A β . Como dato, existen otras líneas de investigación centradas en inhibidores de secretasas.

HALOMETILCETONAS

Inhibidores irreversibles de la GSK-3 β : presenta buena selectividad por quinasas y **neurotransmisores**, además de ser capaz de atravesar la BHE. Su mecanismo de acción consiste en la **formación de un enlace covalente S-C con Cys199** (en la entrada del sitio enzimático de unión al ATP), favorecida por interacciones electrostáticas con Lys85.¹⁴



- 4) **PEPTIDOMIMÉTICOS** → presentan **similitud estructural** con el sustrato (compiten con él), pero poseen **malas características farmacocinéticas**.⁸ A pesar de su **débil inhibición** (los sitios de unión al sustrato varían en gran medida entre quinasas), poseen **alta selectividad**. Cabe destacar que es necesaria la síntesis de péptidos previamente fosforilados, por requerimiento de la GSK-3 β , como es el caso del **L803-mts**. Este péptido, derivado del HSF-1 (factor de transcripción de choque térmico 1), promueve la formación neuronal del hipocampo y la neuroprotección ante apoptosis inducida, con **mucha menor toxicidad neuronal** que otros inhibidores de GSK-3 β . Curiosamente, mientras que el sustrato se une al sitio activo interactuando con Gln89 y Asn95 y necesita alinearse con el dominio catalítico, el L803-mts inhibe al enzima cuando interacciona con **Phe93** sin necesitar esa alineación, lo que nos aclara que existen distintas posibilidades de unión en el bolsillo catalítico de GSK-3 β .¹⁰



5. CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta toda la información recogida la pregunta es: ¿existe alguna esperanza terapéutica real basada en la inhibición de la GSK-3 β ? Definitivamente, ha quedado patente que la **versatilidad del enzima** lo convierte en **diana terapéutica de muchas patologías** multifactoriales además de la EA (diabetes, trastornos bipolares, cáncer, enfermedades inflamatorias crónicas/inmunológicas/neurodegenerativas, etc.)¹⁹, lo que se ve respaldado por el descubrimiento de nuevas funciones biológicas asociadas a la GSK-3 β (en relación a la **neurogénesis y la neuroinflamación**) que aumentan su valor inicial.

Ante todo el abanico de compuestos susceptibles de ser objeto de ensayo clínico, deben elegirse aquellos que muestren un **gran potencial de selectividad** por esta isoforma (e incluso más específicamente por aquella situada en neuronas) y una **afinidad de unión débil-moderada**. Esto nos permitiría una **inhibición ligera**, que sería más beneficiosa en patologías en la que la GSK-3 β está sobreexpresada, ya que impediría que se desarrollase la enfermedad sin afectar a las funciones fisiológicas del enzima (permitiendo que mecanismos alternativos compensasen la posible disminución de la actividad enzimática normal). De esta manera, se conseguiría una **terapia con un balance beneficio-riesgo mucho más favorable**. Finalmente, y a modo de resumen, solo añadir que el futuro del tratamiento farmacológico de la EA parece radicar en fármacos multidiana que no solo inhiban la GSK-3 β , sino que también actúen sobre otros procesos²⁰ que intervienen en la etiología de esta enfermedad, requiriendo siempre monitorización a largo plazo.

BIBLIOGRAFÍA

1. 15.1 La enfermedad de Alzheimer. (14 de abril del 2011). Obtenido el 11/05/2016, de OCW.
2. Muyllaert D, Kremer A, Jaworski T, Borghgraef P, Devijver H, Croes S, Dewachter I, Van Leuven F. Glycogen synthase kinase-3 β , or a link between amyloid and tau pathology? Genes, Brain and Behavior. 2008;7:57-66.
3. ter Haar E, Coll JT, Austen DA, Hsiao HM, Swenson L, Jain J. Structure of GSK3- β reveals a primed phosphorylation mechanism. Nat Struct Biol. 2001 Jul;8(7):593-6.
4. Bradshaw RA, Dennis EA. Handbook of cell signalling. 2ª ed. USA: Academic Press; 2010.
5. Dajani R, Fraser E, Roe SM, Young N, Good V, Dale TC, Pearl LH. Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 β : Structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition. Cell. 2001 June 15;721-32.

6. Medina M, Wandosell F. Deconstructing GSK-3: the fine regulation of its activity. *International Journal of Alzheimer's Disease*. 2011;2011:1-12.
7. Martínez A, Pérez DI. GSK-3 inhibitors: a ray of hope for the treatment of Alzheimer's disease? *J Alzheimer Dis*. 2008 Oct;15(2):181-191.
8. Tenti G. New multicomponent reaction for the synthesis of pyridine derivatives as potential anti-neurodegenerative agents [tesis doctoral]. Universidad Complutense de Madrid; 2015.
9. Martínez A, Castro A, Dorronsoro I, Alonso M. Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) inhibitors as new promising drugs for diabetes, neurodegeneration, cancer, and inflammation. *Med Res Rev*. 2002 Jul;22(4):373-84.
10. Eldar-Finkelman H, Martinez A. GSK-3 inhibitors: preclinical and clinical focus on CNS. *Front Mol Neurosci*. 2011;4(32):1-18.
11. Peng J, Kudrimoti S, Prasanna S, Odde S, Doerksen RJ, Pennaka HK et al. Structure-activity relationship and mechanism of action studies of manzamine analogues for the control of neuroinflammation and cerebral infections. *J Med Chem*. 2010 Jan 14;53(1):61-76.
12. Chou E. Alzheimer's disease: current and future treatments. A review. *Int J Med Students*. 2014 Mar-Jun;2(2):56-63.
13. Martínez A, Alonso M, Castro A, Pérez C, Moreno FJ. First non-ATP competitive glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3 β) inhibitors: thiadiazolidinones (TDZD) as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *J Med Chem*. 2002 Mar 14;45(6):1292-9.
14. Martínez A, Pérez DI, Gil C. Lessons learnt from glycogen synthase kinase 3 inhibitors development for Alzheimer's disease. *Curr Top Med Chem*. 2013;13(15):1808-19.
15. Marshall WJ, Bangert SK, Lapsley M. *Bioquímica clínica*. 7^a ed. Barcelona: Elsevier; 2013.
16. Meijer L, Flajolet M, Greengard P. Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3. *Trends Pharmacol Sci*. 2004 Sep;25(9):471-80.
17. Jacobs KM, Bhawe SR, Ferraro DJ, Jaboin JJ, Hallahan DE, Thotala D. GSK-3 β : A bifunctional role in cell death pathways. *Int J Cell Biol*. 2012 May 21; 2012: 1-11.
18. Cohen P, Frame S. The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(10):769-76.
19. Maqbool M, Mobashir M, Hoda N. Pivotal role of glycogen kinase-3: A therapeutic target for Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem*. 2016 Jan 1;107:63-81.
20. Silva T, Reis J, Teixeira J, Borges F. Alzheimer's disease, enzyme targets and drug discovery struggles: from natural products to drug prototypes. *Ageing Res Rev*. 2014 May;15:116-45.
21. Pandey MK, DeGrado TR. Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3)-targeted therapy and imaging. *Theranostics*. 2016;6(4):571-93.